

Differentiation of immature enterocytes into enteroendocrine cells by Pdx1-overexpression

著者	山田 衆
発行年	2001-03-26
その他の言語のタイトル	Pdx1 遺伝子過剰発現による未分化腸管上皮細胞の腸管内分泌細胞への分化 Pdx1 イデンシ カジョウ ハツゲン ニ ヨル ミブン カ チョウカン ジョウヒ サイボウ ノ チョウカン ナイブンピツ サイボウ ヘノ ブンカ
URL	http://hdl.handle.net/10422/2740

氏名・(本籍)	山田 衆 (京都府)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第377号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成13年3月26日
学位論文題目	Differentiation of immature enterocytes into enteroendocrine cells by Pdx1-overexpression (Pdx1 遺伝子過剰発現による未分化腸管上皮細胞の腸管内分泌細胞への分化)

審査委員	主査 教授	服 部 隆 則
	副査 教授	新 井 良 八
	副査 教授	吉 川 隆 一

論文内容の要旨

【目 的】

腸管内分泌細胞には多くの subtype が存在し、セロトニン及び種々の peptide を産生する。また、腸管内分泌細胞は吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞と共通の発生過程をとることが報告されている。しかしその詳細な分化過程は不明である。最近多くの転写因子がその過程に関与することが報告された。その中でも homeobox gene の Pdx1 は腭ラ氏島、胃、十二指腸に発現し、そのノックアウトマウスでは膵腸管内分泌細胞の分化を障害する事が知られている。我々は未分化腸管上皮細胞に Pdx1 遺伝子を過剰発現し腸管内分泌細胞への分化を検討した。

【方 法】

1. ラット小腸上皮細胞由来の未分化細胞である IEC6 細胞を使用した。
2. マウスの全長 Pdx1 cDNA を発現ベクターに組み込み、IEC6 細胞にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入しスクリーニング後、50個の安定した細胞集団を得た。
3. 50個の細胞集団中 Pdx1 遺伝子の発現が Northern blot 法にて最も強かった2個の細胞集団 (IEC-6-YK14 細胞、IEC-6-YK15 細胞) を以下の実験に用いた。
4. コントロールベクターを発現させた IEC-6-empty 細胞と IEC-6-YK14,15 細胞を micropore filter 上で培養し、Pdx1 蛋白の発現を免疫細胞化学染色にて検討した。
5. IEC-6-empty 細胞と IEC-6-YK14 細胞における内分泌細胞の marker (chromogranin A) と吸収上皮細胞の marker (Apo A-1) の発現を免疫細胞化学染色にて検討した。
6. 各種の腸管内分泌ホルモンの発現を調べるため、IEC-6-YK14 細胞における serotonin/chromograninA と serotonin/somatostatin の免疫二重染色をし、cholecystokinin (CCK) と gastrin の発現を免疫細胞化学染色にて検討した。
7. 電子顕微鏡を用いて IEC-6-YK14 細胞における超微細構造を明らかにし、更に内分泌顆粒の存在を確認する為 immuno-gold を用いた免疫電顕を実施した。
8. Pdx1 過剰発現による腸管の分化に関連する転写因子 (NeuroD/Beta2、HNF1 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF4 α) 発現の変化を RT-PCR 法にて検討した。

【結 果】

1. Pdx1 遺伝子の発現は IEC-6-empty 細胞でも僅かに認められたが、IEC-6-YK14 細胞においては、正常ラットの十二指腸に比べ150倍の強発現が認められた。
2. micropore filter 上で4日間培養することで IEC-6-YK14 細胞は柵状構造を示したが、IEC-6-empty 細胞では柵状構造が認められなかった。
3. Pdx1 蛋白の発現は柵状構造を示した細胞の核に認められたが、それ以外の細胞では細胞質に局在した。IEC-6-empty 細胞ではその発現が同定されなかった。

4. chromogranin A の発現は柵状構造を示した細胞の細胞質に同定されたが、IEC-6-empty 細胞では認められなかった。逆に Apo A1 の発現は IEC-6-YK14 細胞では認められず、IEC-6-empty 細胞で認められた。

5. 二重染色において、柵状構造を示した細胞では serotonin と chromogranin A の発現は完全に重なり、また serotonin と somatostatin の発現も完全に重なることから 1 個の細胞が多種のホルモンを産生することが明らかになった。また、CCK と gastrin も柵状構造を示した細胞の細胞質に同定された。

6. 電子顕微鏡を用いた検討では IEC-6-YK14 細胞は micropore filter に接して一層の薄い細胞質を示す細胞があり、その上に厚い細胞質を有する細胞が重なっていた。後者の細胞は粗面小胞体が発達しており顆粒も観察された。この顆粒内に chromogranin A で標識した immuno-gold 粒子の集積を認めた。

7. 腸管の分化に必要な転写因子 (NeuroD/Beta2、HNF1 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF4 α) の mRNA 発現は IEC-6-empty 細胞及び IEC-6-YK14 細胞ともに認められた。

【考 察】

我々は未分化な腸管上皮細胞を、Pdx1 遺伝子を過剰発現させることにより、2 種類の細胞 (柵状構造を示した細胞と柵状構造を示さない細胞) に分化させることができた。柵状配列した細胞は Pdx1 蛋白が核内に強発現し、各種の腸管ホルモンの発現が認められ、上皮細胞の marker である Apo A1 の発現が消失した事により、Pdx1 遺伝子は腸管内分泌細胞への分化に重要な役割を示す事は明らかとなったが、1つの細胞に多種の内分泌ホルモンが産生され、成熟した腸管内分泌細胞への分化には更に他の因子の関与も考えられ今後の課題である。

【結 論】

未分化腸管上皮細胞に Pdx1 を過剰発現することにより多ホルモン産生腸管内分泌細胞への分化が促進され、腸管内分泌細胞の分化誘導の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

1 型糖尿病に対する再生医学は種々の臓器を対象にして研究されている。本研究は、未分化腸管上皮細胞に転写因子を導入し腸管内分泌細胞に分化させ、腸管を対象にした糖尿病における再生医学の可能性を検討したものである。

Pdx1 遺伝子は転写因子だけでなく、膵臓、十二指腸・胃の内分泌細胞の分化にも必要な分化誘導因子である。この Pdx1 を未分化腸管上皮細胞の培養細胞系である IEC-6 細胞に過剰発現させ、IEC-6-YK14 細胞を樹立した。この細胞には内分泌顆粒が確認され、各種腸管内分泌ホルモンの発現が確認できたが、一つの細胞にセロトニンとソマトスタチンが共発現しており、未分化な内分泌細胞と思われた。

このように本論文は未分化腸管上皮細胞から内分泌細胞への分化について重要な知見を与えたものであり、博士 (医学) の学位論文に値するものである。

なお、本学位授与申請者は平成 13 年 2 月 26 日実施の研究内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。